

氏 名	橋本 直人
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第93
学位授与の日付	平成29年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	皮膚に発現する P-gp と BCRP の経皮基質吸収及び皮膚炎抑制への関与
論 文 審 査 委 員	主査 加藤 将夫
	副査 玉井 郁巳
	副査 中島 美紀
	副査 中西 猛夫
	副査 中道 範隆

学位論文要旨

Abstract

P-gp and BCRP are expressed in skin although their physiological roles in the skin are largely unknown. The purpose of the present study is to clarify their role in transdermal drug absorption and development of dermatitis. Skin and plasma concentrations of Rho123, a substrate of P-gp and BCRP, after dermal application in *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} were lower than wild-type mice. The dermis concentration exhibited obvious reduction. Coadministration of the inhibitor itraconazole reduced skin and plasma concentrations of Rho123 in wild-type mice, and the reduction was also obvious in dermis. Plasma and skin concentrations after dermal application of topical corticosteroids, dexamethasone and prednisolone, in *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} were also lower than wild-type. Thus, these transporters contribute to transdermal absorption of substrates. Oxazolone-induced dermatitis in *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} was more severe than wild-type. Skin concentration of histamine and the number of scratch after dermal application of oxazolone in *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice were higher than wild-type mice. Uptake of histamine in LLC-pK1 cells stably expressing P-gp was lower than control cells. In addition, gene expression of histamine *N*-methyltransferase, which metabolizes histamine, in oxazolone-treated skin of *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice was lower than wild-type. Thus, these transporters may suppress dermatitis by inhibition of histamine accumulation in skin. P-gp and BCRP may thus become a novel target to control transdermal drug absorption and contribute to suppress the pruritus in skin diseases.

要旨

【序論】

皮膚は生体からの水分蒸散や外界からの異物の侵入を防ぎ、生体の恒常性維持を担うバリアとして機能している。これまで皮膚のバリア機能は角質層が構成する物理的バリアが主に担っていると考えられてきた。一方、皮膚には薬物代謝酵素や薬物トランスポーターなど、異物の代謝や排出に働くタンパク質が発現している。このうち、薬物トランスポーターは肝臓や小腸、脳など様々な組織で薬物の体内動態を制御するとともに、内因性の生理活性物質の輸送も担うことで生体の恒常性維持に寄与するため、一部のトランスポーターについてはその機能異常が疾患につながる事例も報告されている。したがって、皮膚においてもトランスポーターが生物学的バリアを構成し、薬物の経皮吸収や皮膚の恒常性維持に寄与している可能性があると考えた。これまで、P-gp は経皮投与後の基質の皮膚移行に関与することや、MRP がヒト表皮ケラチノサイトからの異物の排出に関係することが報告されているものの、これら報告は皮内分布のみの解析や単離細胞を用いた解析であり、*in vivo* での基質の経皮吸収に対するトランスポーターの関与は明らかになっていない。また、Bcrp については、ノックアウト (*Bcrp*^{-/-})マウスで光線過敏症に似た症状やケラチノサイトの分化・増殖の低下による創傷治癒の遅延が報告されているものの、臨床上重要と考えられる病態時での皮膚炎との関連は明らかとなっておらず、P-gp については皮膚疾患との関連は全く明らかになっていない。そこで、本研究では皮膚以外の臓器で薬物動態学的役割が最も解明されている排出トランスポーターである P-gp 及び BCRP に着目し、基質の経皮吸収及び皮膚炎に対する関与を検討した。

【本論】

1. P-gp 及び BCRP を介した Rho123 の経皮吸収及び阻害剤を用いた皮内動態制御

テープストリッピングにより角質層を剥離したマウスの皮膚に Rho123 を経皮投与したところ、皮膚及び血漿中濃度はいずれも wild-type マウスに比べて、P-gp ノックアウト (*Mdr1a/1b*^{-/-}) マウスで低下傾向を示し、P-gp/BCRP ノックアウト (*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}) マウスでは顕著に低下した (Fig. 1)。また、Rho123 経皮投与後の皮膚を表皮及び真皮に分離し、両組織中濃度を評価したところ、表皮中濃度は両マウスで同程度であったが、真皮中濃度は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} マウスで減少した (Fig. 2A)。したがって、皮膚には少なくとも表皮と真皮の2つのコンパートメントが存在することが示唆された。次に、両トランスポーターの阻害剤である

itraconazole を Rho123 と同時に経皮投与したところ、Rho123 の単独投与時と比較して wild-type マウスでは、表皮中濃度は変化しなかったが、真皮及び血漿中濃度の低下が認められた (Fig. 2)。一方、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} マウスでは itraconazole による影響は認められなかった。皮膚におけるトラン

スポーターの発現部位を明らかにするため、マウス及びヒト皮膚の免疫染色を行った。マウス皮膚では P-gp と BCRP の表皮における発現がこれまでに報告されているが、今回、両トランスポーターの真皮血管内皮細胞における発現を明らかにした。一方、ヒト皮膚については表皮基底層と真皮血管内皮細胞における BCRP の発現が認められた。そこで、真皮血管内皮細胞に発現するトランスポーターが血液側から皮膚組織への薬物移行を制限している可能性を考え、マウスに Rho123 を点滴

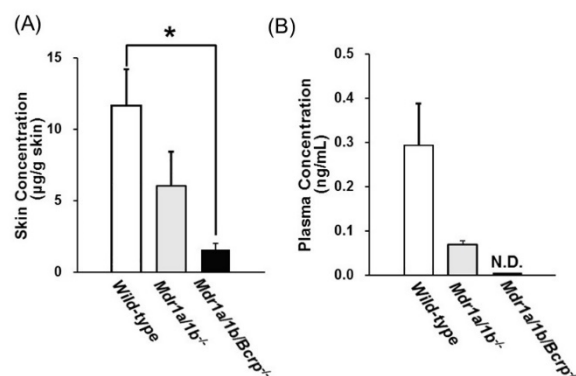


Fig. 1 Transdermal absorption of Rho123 in mice after topical application to the tape-stripped skin.

Rho123 dissolved in saline (100 µL of 0.4 mg/mL) was first applied to a patch for topical administration, and then the patch was applied to the tape-stripped abdominal skin. Concentrations of Rho123 in skin (A) and plasma (B) were measured at 6 h after the start of topical application. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=4). *Significantly different from the wild-type mice ($p < 0.05$). N.D., not detected.

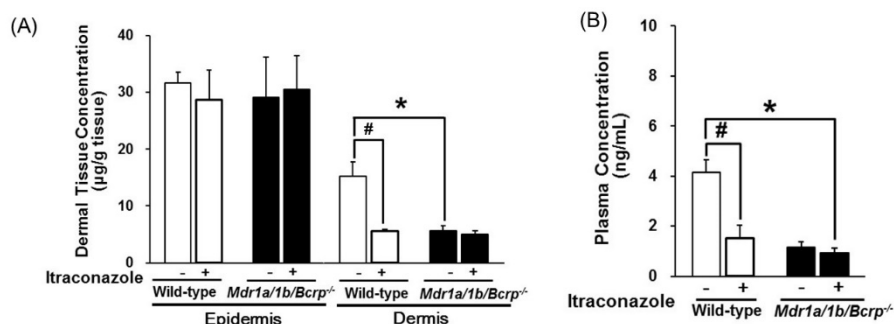


Fig. 2 Inhibitory effect of itraconazole transdermal absorption of Rho123 in the wild-type mice, but not *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice.

Rho123 dissolved in saline (100 µL of 0.4 mg/mL) with or without itraconazole (1 mmol/L) was first applied to a patch, and then the patch was applied to the tape-stripped abdominal skin. Skin and plasma were collected at 6 h after the start of topical application. In panel A, skin was separated into epidermis and dermis parts. Concentrations of Rho123 in epidermis (A), dermis (A) and plasma (B) were measured. Open and closed bars represent the data obtained in the wild-type mice and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice, respectively. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=4). *Significantly different from the wild-type mice ($p < 0.05$). #Significantly different from control mice without itraconazole ($p < 0.05$).

静注後の皮膚/血漿中濃度比を評価した。血漿中濃度推移は wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウス間で差は認められなかったが、皮膚/血漿中濃度比は wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで高かった。したがって、両トランスポーターが Rho123 の血液中からの消失には関与せず、基質の皮膚から血液中への分布を一部制限することが示された。以上の結果から、P-gp と BCRP が *in vivo* で表皮から真皮、真皮から血液中への基質輸送に寄与することを明らかにしたとともに、阻害剤を用いることにより基質の皮内動態を制御できる可能性が示された。

2. P-gp を介した外用ステロイドの経皮吸収

P-gp 及び BCRP は様々な薬物を基質として認識することから、外用薬として使用されている薬物の経皮吸収に対しても関与する可能性がある。そこで、外用ステロイドの経皮吸収に対する P-gp と BCRP の関与を検討した。外用ステロイドである dexamethasone をテープストリッピングにより角質層を剥離したマウスの皮膚に経皮投与し、皮膚及び血漿中濃度を評価した。血漿中濃度は投与後 6 時間まで wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで低く推移し、投与後 6 時間における皮膚中濃度も *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで低下した

(Fig. 3A, B)。また、投与後 6 時間の皮膚について、表皮及び真皮中濃度を評価した結果、表皮中濃度は両マウスで同程度であったが、真皮中濃度は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで低下が認められ、Rho123 の経皮投与時と同様の結果を示した (Fig. 3C)。一方、dexamethasone の点滴静注時においては、両マウスで血漿中濃度推移に差は認められず、両トランスポーターが dexamethasone の消失には関与しないことが確認された (Fig. 4A)。さらに、様々な部位の皮膚について、点滴静注時の皮膚/血漿中濃度比を評価したが、wild-type 及び *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウス間に有意な差は見られなかった (Fig. 4B)。一方、表皮と真皮を分離評価したところ、脇腹皮膚の表皮中濃度は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで増加したことから、dexamethasone の表皮から真皮への輸送に対するトランスポーターの関与が認められた (Fig. 4C)。

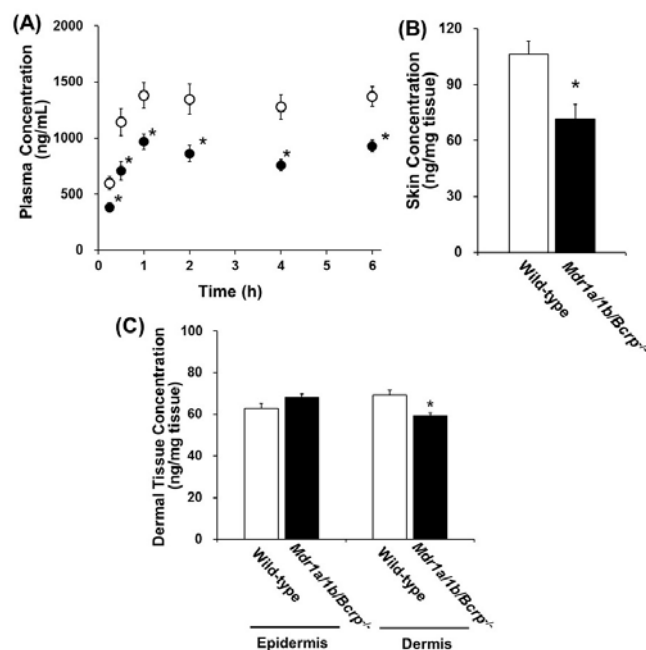


Fig. 3 Transdermal absorption of dexamethasone in mice after topical application to tape-stripped skin.

Dexamethasone dissolved in DMSO (30 µL of 50 mg/mL) was applied to two patches for topical administration, and the patches were applied to tape-stripped abdominal skin. The concentration of dexamethasone in plasma (A) was measured in wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (closed circles) mice. Concentrations in skin (B), epidermis (C) and dermis (C) were also measured at 6 h after the start of topical application in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (closed columns) mice. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 4-9).

*Significantly different from wild-type mice ($p < 0.05$).

外用ステロイドである prednisolone についても同様に *in vivo* 経皮投与を行ったところ、経皮投与後の皮膚及び血漿中 prednisolone 濃度は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで低下した。そこで、P-gp 及び BCRP による dexamethasone 及び prednisolone の輸送を確認するため、両トランスポーターの安定発現細胞を用いた経細胞輸送実験を実施した。その結果、P-gp 安定発現細胞を用いた経細胞輸送実験より、P-gp による dexamethasone 及び prednisolone の輸送を確認した一方で、BCRP 安定発現細胞では輸送は見られなかった。

以上の結果から、皮膚の P-gp は臨床外用薬である dexamethasone を含む一部のステロイドの表皮から真皮への吸収方向の輸送に寄与することが示された。

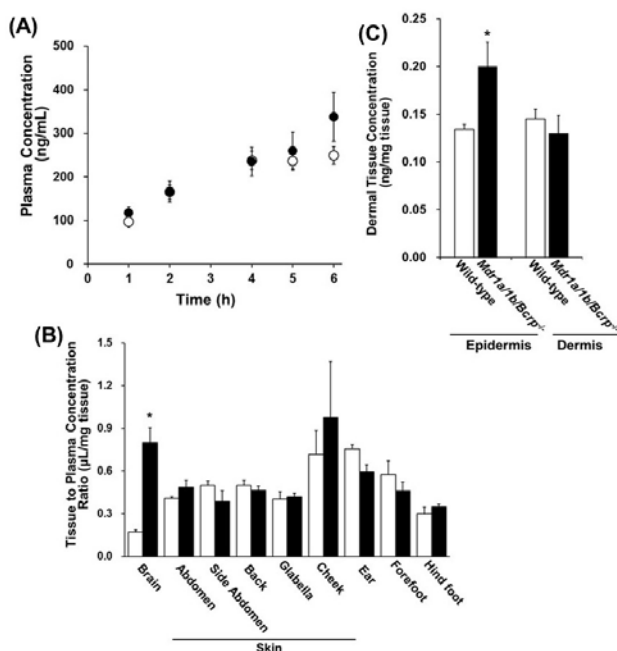


Fig. 4. Plasma concentration and tissue distribution of dexamethasone in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice during intravenous infusion.

Dexamethasone was intravenously infused at a rate of 100 ng/min. The concentration of dexamethasone in plasma (A) was measured in wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (closed circles) mice. Tissue-to-plasma concentration ratios (B), and concentrations in epidermis and dermis of the side abdominal skin (C) were also measured at 6 h after the start of infusion in wild-type (open columns) and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (closed columns) mice. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=4-5). *Significantly different from the wild-type mice ($p < 0.05$).

3. P-gp 及び BCRP による oxazolone 誘発皮膚炎の抑制

次に、P-gp 及び BCRP の薬物動態以外の役割の解明を目指し、皮膚炎に及ぼす影響を解析した。両トランスポーターはともに様々な薬物を認識すること、さらに経皮投与においては極めて高濃度の薬物が皮膚に接触するため、皮膚炎症時における役割が明らかになれば、外用剤として用いるべき薬物の選択や臨床使用時における副作用などに関する有益な情報が得られることが考えられる。実際、*Mdr1a*^{-/-}マウスでは潰瘍性大腸炎に類似した腸炎を自然発症することや、*Bcrp*^{-/-}マウスでは pheophorbide a の経口摂取後に光線過敏症に似た症状を示すことが知られており、薬物動態以外の役割も徐々に解明されつつある。まず、皮膚炎誘発物質である oxazolone をマウスの耳及び体部皮膚に塗布して感作を行い、その 8 日後より 2 日に 1 回の頻度で反復塗布をして皮膚炎を誘発した。Oxazolone 反復塗布時における耳介厚は wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで高く推移した (Fig. 5A)。また、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスでは oxazolone 塗布部の脇腹皮膚においても紅斑や、痂皮、落屑など皮膚炎症状の増悪を認めたこと (Fig. 5B)から、P-gp 又は BCRP が皮膚炎の抑制に寄与すると考えられた。

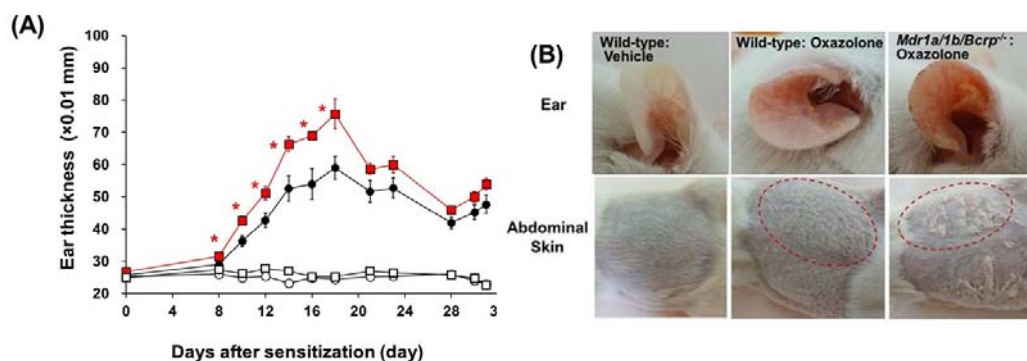


Fig. 5 The difference of oxazolone-induced chronic dermatitis in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice. Ear thickness in oxazolone-treated *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (closed red squares) mice was increased compared to that in oxazolone-treated wild-type (closed black circles), vehicle-treated wild-type (open circles) and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} (open squares) mice for day 18 (A). Clinical symptoms of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice at day 18 (B). The repeated application of oxazolone to the ear and abdominal skin caused erythema, induration and abrasion. Each point represents mean \pm S.E.M (n=4-9). When error bars are not shown, they were smaller than the symbols. *Significantly different from wild-type mice ($p < 0.05$).

そこで、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスにおける皮膚炎の増悪に関与する炎症性基質を見出すため、メタボローム解析を行ったところ、wild-type マウスに比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスの炎症皮膚では histamine 及びその代謝物である 1-methylhistamine が増加した。そこで、LC/MS/MS を用いて、oxazolone 反復塗布後の炎症皮膚における histamine 及び 1-methylhistamine 濃度を改めて評価した結果、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスの炎症皮膚ではいずれも増加を認めた(Fig. 6)。

痒みを伴う炎症性皮膚疾患においては、痒みに伴う搔破行動が、皮膚バリアの破壊を引き起こし、炎症の増悪、さらには痒みを増悪させる悪循環が存在する。また、histamine は痒みを引き起こす代表的な物質である。そこで、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスにおける皮膚炎増

悪のメカニズムとして、この悪循環が起こっている可能性を考え、oxazolone 反復塗布時の搔破回数を計測した。Wild-type に比べて、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスでは搔破回数が増加した。*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで histamine の皮膚中濃度が増加した原因として、P-gp 又は BCRP による皮膚から血液中への histamine の排出の低下、histamine の生合成の亢進あるいは代謝の低下が考えられる。そこで、P-gp 又は BCRP 安定発現細胞を用いた histamine の細胞内取り込み実験を実施した。P-gp 安定発現細胞における histamine の細胞内取り込み量は、コントロール細胞と比較して、低かった。しかし、いくつかの P-gp 阻害剤を検討したものの、発現系特異的な阻害効果（取り込み量の増加）は見られ

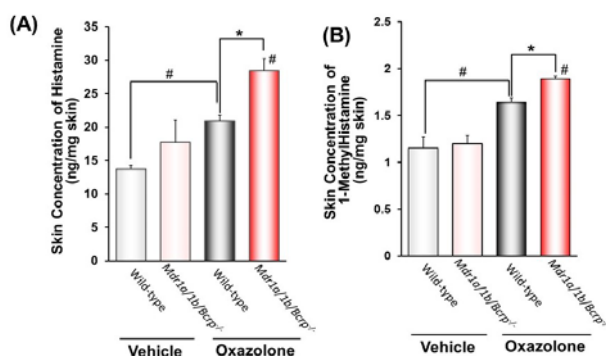


Fig. 6 Skin concentration of histamine and 1-methylhistamine in wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice repeatedly exposed to oxazolone.

Mice were repeatedly challenged on the sensitized skin with oxazolone three times per week. Histamine (A) and 1-methylhistamine (B) concentration in skin of wild-type and *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-} mice were analyzed at day 18. Each point represents mean \pm S.E.M (n=4-12). * Significantly different from wild-type mice ($p < 0.05$). # Significantly different from the vehicle treatment group ($p < 0.05$).

なかった。一方、oxazolone 反復塗布後の *Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウス皮膚では wild-type に比べて、histamine 代謝酵素である histamine N-methyltransferase の遺伝子発現量が低下した。以上より、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウスで炎症が増悪したメカニズムの解明には更なる検討が必要であるが、histamine の代謝酵素の発現低下により histamine が皮膚に蓄積し、掻破行動の増加に伴う皮膚炎悪化の可能性が考えられた。P-gp 及び BCRP が histamine の皮内蓄積の抑制を介して痒み及び掻破を抑え、皮膚炎の抑制に寄与する可能性が示された。

【結論】

P-gp 及び BCRP が基質の経皮吸収に寄与すること、P-gp については臨床外用薬である一部のステロイドの経皮吸収に寄与することが示された。併せて、トランスポーター阻害剤の使用は基質を表皮に留め、真皮及び血液中への移行を抑制できる可能性が示された。阻害剤の利用によるトランスポーターを標的とした皮内動態制御法は、基底細胞癌など表皮に病巣を有する疾患において、標的部位への選択的な薬物輸送を可能にするとともに、トランスポーターによる癌細胞からの薬物の排出を抑制することで効力の増強や持続、副作用の軽減につながる有用な技術になることが期待される。また、経皮吸収への関与に加えて、P-gp 及び BCRP が histamine の皮内蓄積、さらには痒みを抑制することで皮膚炎の抑制に寄与する可能性が示された。Histamine はアトピー性皮膚炎や蕁麻疹など、様々な皮膚疾患に関係する痒みのメディエーターであることから、P-gp 及び BCRP が様々な皮膚疾患における痒みの抑制に関与している可能性が示された。併せて、ステロイドのような P-gp 又は BCRP 誘導剤が痒みに対する治療効果を有する可能性とともに、doxorubicin や EGFR 阻害剤などの P-gp 又は BCRP 阻害剤を用いた治療時には、痒みや炎症などの副作用に留意する必要性が示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、皮膚で遺伝子発現が認められる薬物排出膜輸送体 P-glycoprotein (P-gp) と Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) の皮膚での役割の解明を目指すものである。角質層を剥離した正常マウス皮膚に典型基質 rhodamine123 を投与し、皮膚および血中への経皮吸収を測定したところ、これら膜輸送体の遺伝子欠損や阻害剤併用によって経皮吸収が低下したことから、P-gp および BCRP が基質の経皮吸収に関与することが明らかとなった。臨床で貼付薬として用いられる種々の薬物を検討したところ、dexamethasone も同様に P-gp によって経皮吸収されることが示唆された。炎症時の役割解明を目的として、マウス皮膚炎モデルを作製したところ、これら膜輸送体の遺伝子欠損で皮膚炎が悪化した。メタボローム解析により、搔破誘導因子であるヒスタミンが欠損マウスで増加していることが示され、これら膜輸送体がヒスタミンの皮膚蓄積に関与し、搔破行動を促した結果、皮膚炎が悪化することが示唆された。以上の知見は、膜輸送体が薬物の経皮吸収に関与することを示した初めての報告であり、膜輸送体を利用した経皮製剤の開発や、膜輸送体と相互作用する薬物の皮膚における作用を理解する上で有用な知見であり、本研究は博士(創薬科学)に値すると判定された。